

Echinococcus multilocularis (Em18) IgG ELISA

Enzimski imunotest za serološko praćenje humane alveolarne ehinokokoze

96 testova na pojedinačnim jažicama za in vitro dijagnostičku upotrebu i za profesionalnu laboratorijsku upotrebu



Upute za upotrebu za br. artikla **9310**
UDI-DI: 07640158219317



Predviđena upotreba:

Komplet Bordier *Echinococcus multilocularis* (Em18) IgG ELISA namijenjen je za kvalitativno prepoznavanje antitijela protiv Em18 *Echinococcus multilocularis* u ljudskom serumu. Ovaj test namijenjen je poslijeoperativnim i/ili poslijeterapijskim naknadnim pretragama zaraženih bolesnika.

Pozadina:

Alveolarnu ehinokokozu uzrokuje stadij ličinke trakavice *Echinococcus multilocularis* koja se može pronaći u lisica, kojota, pasa i drugih psolikih zvijeri. Ljudi se mogu zaraziti slučajnom konzumacijom zaraženih jajašaca trakavice iz kontaminirane hrane ili vode. Oblici ličinki *E. multilocularis* ne sazrijevaju u cijelosti u plodne ciste u ljudima, no trajna proliferacija vezikula koje prodiru u okolno tkivo i uništavaju ga uzrokovat će, nalik tumoru, disfunkciju jetara. Parazit se može širiti i u druge organe kao što su pluća i mozak. Glavni su simptomi bol u trbuhu, astenija, hepatomegalija i žutica. Dijagnoza se temelji na metodama snimanja kao što su CT snimke radi vizualnog prepoznavanja parazitskih nakupina i povezana difuziranja struktura nalik cistama. Serološka testiranja upotrebljavaju se za pregled rizičnih populacija i naknadne pretrage bolesnika koji boluju od alveolarne ehinokokoze nakon liječenja.

Načelo i prezentacija:

Komplet osigurava sve potrebne materijale za provedbu 96 imunoenzimskih testova povezanih s enzimima (ELISA) na lomljivim jažicama mikrotitracijske pločice senzibiliziranim rekombinantnim antigenom ***Echinococcus multilocularis* Em18**. Specifična antitijela u uzorku povezat će se s tim antigenima, a ispiranjem će se ukloniti nespecifična antitijela. Prisutnost parazitskih specifičnih antitijela prepoznaje se s konjugatom alkalne fosfataze proteina A. Drugim korakom ispiranja uklonit će se nevezani konjugat. Otkrivanje vezanih antitijela provodi se dodavanjem supstrata pNPP-a koji poprima žutu boju kada je prisutna alkalna fosfataza. Jačina boje proporcionalna je količini antitijela specifičnih za parazit *Echinococcus multilocularis* u uzorku. Za zaustavljanje reakcije dodaje se kalijev fosfat. Apsorpcija pri 405 nm očitava se upotrebom čitača mikrotitrirajućih pločica ELISA. Test je ručni, ali se može provesti automatskim sustavima, koje korisnik mora potvrditi.

Materijal sadržan u kompletu (96 testova):

WELL	9310-01	Lomljive trake ELISA senzibilizirane sa <i>Echinococcus multilocularis</i> Em18 rekombinantni antigen	96	jažica
DILB	9310-02	Koncentrat pufera za razrjeđivanje (10 x), obojen ljubičasto	50	ml
WASH	9310-03	Koncentrat otopine za ispiranje (10 x)	50	ml
ENZB	9310-04	Enzimski pufer	50	ml
STOP	9310-05	Otopina za zaustavljanje (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9310-06	Negativni kontrolni serum (20 x), zeleni čep	200	μl
CONTROL -/+	9310-07	Slab pozitivni kontrolni serum (prekinut, 20 x), žuti čep	200	μl
CONTROL +	9310-08	Pozitivni kontrolni serum (20 x), crveni čep	200	μl
CONJ	9310-09	Protein A - konjugat alkalne fosfataze (50 x), ljubičasti čep	300	μl
SUBS	9310-10	Supstrat fosfataze (para-nitrofenilfosfat)	20	tableta
		Spremnik s više pipeta, 25 ml	1	komad
		Okvir za držač za 8 jažica ELISA	1	komad

Vijek trajanja i čuvanje:

Čuvajte komplet između +2°C i +8°C (transport potvrđen između -20°C i +37°C tijekom 21 dana), izbjegavajte dulje izlaganje komponenti izravnu svjetlu. Datum isteka roka valjanosti i broj serije kompleta otisnuti su na bočnoj strani kutije. Reagensi su nakon prvog otvaranja stabilni do datuma isteka roka valjanosti ako se čuvaju na temperaturi između +2°C i +8°C.

Potrebna oprema koja nije isporučena uz komplet:

Pipete (ml i μl). Tikvice. Cijevi za razrjeđivanje. Ljepljiva traka za prekrivanje jažica tijekom inkubacija. Destilirana voda. Inkubator postavljen na +37°C. Komplet čitača ELISA postavljen na 405 nm. Ručna ili automatska oprema za ispiranje jažica. Vrtložna miješalica. Brojač vremena.

Priprema reagensa prije upotrebe:

Sve reagense ostavite na temperaturi između +20°C i +30°C najmanje 1 sat i promiješajte prije upotrebe.

Jažice ELISA: otvorite bočni dio aluminijske vrećice 9310-01 i izvadite onoliko jažica koliko je potrebno (jedna za prazan položaj, tri za kontrole plus za broj uzoraka). Postavite dezinficirane jažice u držač(e) za 8 jažica. Ako je potrebno, popunite prazne položaje u držaču rabljenim jažicama. Umetnite držač(e) u okvir u ispravnom smjeru. Ponovno zatvorite otvoreno pakiranje i umetnite jastučić za odvlaživanje.

Pufer za razrjeđivanje: razrijedite koncentrat pufera za razrjeđivanje (10 x) 9310-02 u omjeru od 1 : 10 u destiliranoj vodi. Upotrebljava se za razrjeđivanje kontrola, uzoraka i konjugata. Razrijeđeni pufer stabilan je tijekom razdoblja od 2 mjeseca na temperaturi između +2°C i +8°C.

Otopina za ispiranje: razrijedite koncentrat otopine za ispiranje (10 x) 9310-03 u omjeru od 1 : 10 u destiliranoj vodi. Možete se koristiti i vlastitom otopinom za ispiranje. Izbjegavajte upotrebu pufera koji sadrže fosfat jer bi se njima mogla spriječiti enzimatska aktivnost alkalne fosfataze. Razrijeđena otopina za ispiranje stabilna je tijekom razdoblja od 2 mjeseca na temperaturi između +2°C i +8°C.

Kontrolni serumi: razrijedite 10 µl kontrolnih seruma 9310-06 do -08 u 190 µl otopine pufera za razrjeđivanje (konačno razrjeđivanje u omjeru od 1 : 20). Razrijeđeni kontrolni serumi stabilni su tijekom razdoblja od 2 mjeseca na temperaturi između +2°C i +8°C.

Konjugat: razrijedite konjugat 9310-09 u otopini pufera za razrjeđivanje (konačno razrjeđivanje u omjeru od 1 : 50). Razrijedite konjugat na dan provedbe testa. Nemojte čuvati već razrijeđeni konjugat.

Otopina supstrata: otopite tabletu (ili tablete) supstrata fosfataze 9310-10 u nerazrijeđenom enzimskom puferu 9310-04 (1 tableta u 2,5 ml pufera). Miješajte u vrtložnoj miješalici do potpunog otapanja tablete (ili tableta). Razrijedite supstrat na dan provedbe testa i zaštitite cijev od izravna svjetla. Tablete i otopine supstrata morale bi biti bezbojne ili imati tek žućkastu nijansu. Ako tableta ili otopina supstrata poprimi žutu boju, možda je djelomično hidrolizirana i mora se zbrinuti u otpad. Nemojte čuvati otopinu supstrata.

Otopina za zaustavljanje: upotrijebite nerazrijeđeni reagens 9310-05.

Prikupljanje i priprema uzoraka:

Upotrebljavajte ljudski serum. Serum treba čuvati na temperaturi između +2°C i +8°C ako se test izvede unutar 7 dana, a u protivnom na temperaturi od -20°C ili nižoj. Izbjegavajte opetovano zamrzavanje i odmrzavanje.

Miješajte uzorke u vrtložnoj miješalici i razrijedite ih u omjeru od 1 : 201 u otopini pufera za razrjeđivanje (na primjer, uzorak od 5 µl u 1,0 ml). Nemojte čuvati razrijeđeni uzorak.

Upozorenja i mjere predostrožnosti:

Toksični spojevi postoje u sljedećoj koncentraciji:

Komponenta	Referenca	Natrijev azid (NaN ₃)	Mertiolat
Pufer za razrjeđivanje (10 x)	9310-02	0,1%	0,02%
Otopina za ispiranje (10 x)	9310-03	0,05%	/
Enzimski pufer	9310-04	0,01%	/
Kontrolni serumi (20 x)	9310-06 do -08	0,1%	0,02%
Konjugat (50 x)	9310-09	0,1%	/

U pogledu rabljenih koncentracija, natrijev azid i mertiolat ne predstavljaju toksikološki rizik pri dodiru s kožom i sluznicama.

Komponenta	Opasna komponenta	Opasnosti piktogram	Oznaka opasnosti	Izjava o mjerama opreza
Otopina za zaustavljanje	kalijev fosfat, trobazni		Uzrokuje teške ozljede oka	Nositi zaštitu za oči. U SLUČAJU DODIRA S OČIMA: Oprezno ispirati vodom nekoliko minuta. Ukloniti kontaktne leće, ukoliko ih nosite i ako se one lako uklanjaju. Nastaviti ispiranje.

- Negativni, slabo pozitivni i pozitivni kontrolni serumi (9310-06 do -08) su životinjskog podrijetla (kunići) i s njima se mora pažljivo rukovati.
- Postupajte sa svim reagensima i uzorcima kao s potencijalno infektivnim materijalom.
- Nemojte međusobno zamjenjivati reagense različite broj serije ni kompleta Bordier ELISA.
- Nemojte upotrebljavati reagense drugih proizvođača s reagensima iz ovog kompleta.
- Nemojte upotrebljavati reagense nakon isteka roka valjanosti.
- Čvrsto zatvorite bočice s reagensom neposredno nakon upotrebe i nemojte međusobno zamjenjivati čepove kako biste izbjegli kontaminaciju.
- Koristite se zasebnim i čistim vrhovima pipeta za svaki uzorak.
- Nemojte ponovno upotrebljavati mikrojažice.

- Spriječite propadanje mikrojažica mehaničkim djelovanjem (vrhovi/stošci, štrcaljke).
- Opisi simbola rabljenih na oznakama mogu se pronaći na web-mjestu www.bordier.ch.

Upute o zbrinjavanju u otpad:

Svi materijali koji se upotrebljavaju za ovaj test načelno se smatraju opasnim otpadom. Poštujte nacionalne te lokalne zakone i propise za zbrinjavanje opasnog otpada.

Postupak:

Tijekom provedbe testa spriječite stvaranje mjehurića u jažicama.

1. korak: Predinkubacija:

Napunite jažice s 250 µl otopine pufera za razrjeđivanje.

Inkubirajte 5 do 15 minuta između +20°C i +30°C.

Uklonite pufer za razrjeđivanje aspiracijom ili tako što ćete jažice protresti nad sudoperom.

2. korak: Inkubacija s uzorcima:

Napunite prvu jažicu prve trake samo upotrebom 100 µl pufera za razrjeđivanje (prazan položaj bez seruma).

Svaku od naknadnih triju jažica napunite upotrebom 100 µl razrijeđenog negativnog, slabo pozitivnog (prekinutog) i pozitivnog kontrolnog seruma. Za testove s više od 25 uzoraka, preporučujemo punjenje posljednjih triju jažica kontrolnim serumima kao duplikatom.

Napunite preostale jažice razrijeđenim uzorcima (svaku sa 100 µl).

Prekrijte jažice ljepljivom trakom i inkubirajte 30 minuta na +37°C.

Uklonite serume i isperite 4 puta upotrebom ~ 250 µl otopine za ispiranje.

3. korak: Inkubacija s konjugatom:

Raspodijelite 100 µl razrijeđenog konjugata u svaku jažicu (uključujući prazan položaj bez seruma).

Prekrijte jažice ljepljivom trakom i inkubirajte 30 minuta na +37°C.

Uklonite konjugat i isperite 4 puta upotrebom ~ 250 µl otopine za ispiranje.

4. korak: Inkubacija sa supstratom:

Raspodijelite 100 µl otopine supstrata u svaku jažicu.

Prekrijte jažice ljepljivom trakom i inkubirajte 30 minuta na +37°C.

Zaustavite reakciju dodavanjem 100 µl otopine za zaustavljanje u svaku jažicu.

5. korak: Mjerenje apsorpcija:

Ako je potrebno, prebrišite dno jažica i uklonite mjehuriće. Mjerite apsorpcije pri 405 nm unutar sat vremena nakon dodavanja otopine za zaustavljanje.

Tumačenje:

Oduzmite vrijednost prazan položaj bez seruma od svih izmjerenih vrijednosti. Ako je primjenjivo, izračunajte srednje vrijednosti apsorpcije dupliciranih serumskih kontrola. Test je valjan ako su ispunjeni sljedeći preduvjeti:

- apsorpcija (A) pozitivne kontrole > 1,200
- A slabe pozitivne kontrole > 3 % A pozitivne kontrole
- A negativne kontrole > 3 % A pozitivne kontrole
- A prazan položaj bez seruma < 0,350.

U slučaju da uzorak daje signal koji prelazi raspon mjerenja čitača mikropločice, treba dodijeliti vrijednost koja odgovara gornjem rasponu mjerenja čitača.

Kontrole kvalitete trenutačnih serija objavljene su na našem web-mjestu www.bordier.ch.

Koncentracija antitijela u slabo pozitivnom (prekinutom) serumu 9310-07 postavljena je za optimalno razlikovanje između seruma klinički dokumentiranih slučajeva alveolarne ehinokokoze i zdravih ljudskih seruma.

Indeks prekida uzorka definira se, nakon oduzimanja prazan položaj bez seruma, kao:

$$\text{indeks} = \frac{\text{apsorbirani uzorak}}{\text{apsorbirani prekinuti serum}}$$

Rezultat je **negativan** kada je indeks analiziranog uzorka niži od 1,0. U ovom je slučaju, koncentracija antitijela IgG protiv antigena *Echinococcus multilocularis* klinički beznačajna.

Rezultat je **pozitivan** kada je indeks analiziranog uzorka veći ili jednak 1,0. U ovom se slučaju, koncentracija antitijela IgG protiv antigena *Echinococcus multilocularis* smatra klinički značajnom.

Smanjenje ili negativizacija razina antitijela u serumu anti-recEm18 označava potpunu kiruršku resekciju parazitske lezije ili inaktivaciju parazita liječenjem lijekovima.

U slučaju sumnjiva rezultata preporučujemo provedbu testa u svrhu potvrđivanja (najčešće testom Western blot) ako je takav test dostupan ili ako je propisan nacionalnim odredbama.

Analitički rezultati:

Analitička specifičnost:

Specifičnost od 100% pronađena je u 12 seruma bolesnika s drugim oblicima parazitskih infekcija (6 s cističnom ehinokokozom, 3 s nediferenciranom ehinokokozom i 3 s alternativnim dijagnozama).

Ni pozitivna ni negativna interferencija nije zapažena za suprafiziološke koncentracije hemoglobina, lipida ili bilirubina u serumima dopunjenim interferentima.

Preciznost:

Ponovljivost je bila procijenjena testiranjem 2 uzorka ljudskih seruma u 24 jažice na 1 testu.

Reproducibilnost je bila procijenjena testiranjem 2 uzorka ljudskih seruma duplikatu u 10 različitim testova.

	Ponovljivost		Reproducibilnost	
	1. uzorak	2. uzorak	1. uzorak	2. uzorak
Prosjeak (apsorpcija)	0,186	1,260	0,157	1,123
Standardno odstupanje (apsorpcija)	0,022	0,072	0,016	0,076
Koeficijent varijacije (%)	11,8	5,7	10,5	6,8

Klinički rezultati:

Dijagnostička osjetljivost:

Istraživani su upareni pred- i poslijeoperativni uzorci seruma 12 bolesnika s potvrđenom alveolarnom ehinokokozom koji su imali radikalnu ili neradikalnu operaciju. Predoperativno je 9 bolesnika (75%) imalo indeks >1. Među tim bolesnicima, 5 ih je imalo negativne poslijeoperativne rezultate. No u svih 12 bolesnika, poslijeoperativne razine antitijela Em18 smanjile su se i bile znatno niže nego u predoperativnim uzorcima.

Istraživani su uzorci seruma 25 bolesnika s potvrđenom alveolarnom ehinokokozom bez operacije, no sa stabilnom bolešću, na antiparazitskoj kemoterapiji. Njih 18 (72%) imalo je indeks >1 (srednji indeks 6,3). Istraživani su uzorci seruma 7 bolesnika s potvrđenom alveolarnom ehinokokozom bez operacije, no s progresivnom bolešću, na antiparazitskoj kemoterapiji. Njih 6 (86%) imalo je indeks >1 (srednji indeks 13,8).

Dijagnostička specifičnost:

Specifičnost od 98% pronađena je u 99 seruma (švicarskih) darivatelja krvi. Specifičnost od 94% pronađena je u 100 seruma od bolesnika (švicarske) infektološke jedinice.

Pozitivna i negativna predvidljiva vrijednost:

PPV od 80% i NPV od 96% pronađene su u spomenutim populacijama.

Očekivane vrijednosti u normalnim i pogođenim populacijama:

U normalnoj populaciji od 99 švicarskih darivatelja krvi i 100 seruma iz švicarske infektološke jedinice, očekivana indeksna vrijednost iznosi 0,33. Podatci o očekivanoj indeksnoj vrijednosti u pogođenoj populaciji nisu bili dostupni.

Incidenti:

Svaki ozbiljan incident koji nastupi u vezi s proizvodom mora se prijaviti proizvođaču i nadležnom tijelu države članice u kojoj korisnik i/ili bolesnik ima prebivalište.

Ograničenja:

Dijagnoza zarazne bolesti ne smije se postaviti na temelju rezultata jednog testa. Precizna dijagnoza u obzir mora uzeti endemsku situaciju, kliničku povijest, simptomatologiju, podatke snimki te serološke podatke.

U imunokompromitiranih pacijenata i novorođenčadi serološki su podatci ograničene valjanosti.

Reference:

Tappe, D., Frosch, M., Sako, Y., Itoh, S., Gruner, B., Reuter, S., et al. (2009) Close relationship between clinical regression and specific serology in the follow-up of patients with alveolar echinococcosis in different clinical stages. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **80** : 792-7.

Ishikawa, Y., Sako, Y., Itoh, S., Ohtake, T., Kohgo, Y., Matsuno, T., et al. (2009) Serological monitoring of progression of alveolar echinococcosis with multiorgan involvement by use of recombinant Em18. *J. Clin. Microbiol.* **47** : 3191-6.

Tappe, D., Sako, Y., Itoh, S., Frosch, M., Gruner, B., Kern, P., Ito, A. (2010) Immunoglobulin G subclass responses to recombinant Em18 in the follow-up of patients with alveolar echinococcosis in different clinical stage. *Clin Vaccine Immunol.* **17** : 944-8.

Ammann, R.W., Stumpe, K.D.M., Grimm, F., Deplazes, P., Huber, S., Bertogg, K., et al. (2015) Outcome after discontinuing long-term benzimidazole treatment in 11 patients with non-resectable alveolar echinococcosis with negative FDG-PET/CT and anti-Em18/3-10 serology. *PLoS Negl Trop Dis.* **9**.

Sulima, M., Szostakowska, B., Nahorsk, W., Sikorska, K., Wolynec, W. and Waz, P. (2019) The usefulness of commercially available serological tests in the diagnosis and monitoring of treatment in patients with alveolar echinococcosis. *Clin. Exp. Hep.* **5** : 327-333.

Hotz, J.F., Peter, L., Kapp-Schworer, S., Theis, F., Eberhardt, N., Essig, A. et al. (2022) Evaluation of Serological Markers in Alveolar Echinococcosis Emphasizing the Correlation of PET-CTI Tracer Uptake with RecEm18 and Echinococcus-Specific IgG. *Pathogens* **11**020239.



BORDIER AFFINITY PRODUCTS S.A.
Rue de Morges 22, 1023 Crissier, Switzerland.
+41 21 566 17 18 cb@bordier.ch www.bordier.ch

